

26
Blel



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/08971 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. März 1998 (05.03.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/01894 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. August 1997 (26.08.97) (30) Prioritätsdaten: 196 35 609.1 26. August 1996 (26.08.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INVITEK GMBH [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HILLEBRAND, Timo [DE/DE]; Bansiner Strasse 60, D-12619 Berlin (DE). BERNDT, Hans-Christoph [DE/DE]; Florapromenade 24, D-13187 Berlin (DE). BENDZKO, Peter [DE/DE]; Ifflandstrasse 32, D-12623 Berlin (DE). (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: METHOD TO DETECT CLINICALLY RELEVANT MUTATIONS OF THE DNA SEQUENCE OF KI-RAS ONCOGENE, ITS USE AND A TESTKIT FOR EARLY DIAGNOSIS OF TUMOURS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS KLINISCH RELEVANTER VERÄNDERUNGEN DER DNS-SEQUENZ DES KI-RAS-ONKOGENS, SEINE VERWENDUNG UND TESTKIT ZUR FRÜHERKENNUNG VON TUMOREN (57) Abstract <p>Disclosed is a method to detect clinically relevant mutations of the DNA sequence of the ki-ras oncogene in stool DNA, its use and a test kit based thereon for early diagnosis of tumours, especially tumours of the pancreas and the colon. According to the invention the method of detection is distinguished by extraction of genomic DNA from stool samples in a series of cleaning operations designed to eliminate inhibitor substances, and by base-complementary hybridization reaction by adding six different oligonucleotides with a defined complementarity to the clinically relevant mutated sequence fragments of the ki-ras gene.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis klinisch relevanter Veränderungen der DNS-Sequenz des Ki-ras-Onkogens in Stuhl-DNS, seine Verwendung sowie einen darauf aufbauenden Testkit zur Früherkennung von Tumoren, insbesondere von Tumoren des Pankreas und Colon. Das Nachweisverfahren ist erfindungsgemäß gekennzeichnet durch Extraktion genomischer DNS aus Stuhlproben über multiple Reinigungsschritte zur Eliminierung inhibitorischer Stoffe und basenkomplementäre Hybridisierungsreaktion durch Zugabe von sechs verschiedenen Oligonukleotiden mit definierter Komplementarität zu klinisch relevanten veränderten Sequenzabschnitten des Ki-ras-Gens.</p>			

Verfahren zum Nachweis klinisch relevanter Veränderungen der DNS-Sequenz des Ki-ras-Onkogens, seine Verwendung und Testkit zur Früherkennung von Tumoren

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis klinisch relevanter Veränderungen der DNS-Sequenz des Ki-ras-Onkogens in DNS, vorzugsweise in Stuhl-DNS, seine Verwendung sowie einen Testkit zur Früherkennung von Tumoren, insbesondere von Tumoren des Pankreas und Dickdarms.

Dickdarm- und Pankreastumore zählen zu den weltweit häufigsten Krebserkrankungen und stehen an dritter bzw. vierter Stelle in der Mortalitätsstatistik von Malignomen. Die Problematik dieser Erkrankungen tritt besonders deutlich beim Pankreaskarzinom zutage. Bedingt durch einen über lange Zeit symptomlosen Verlauf werden Pankreaskarzinome so spät diagnostiziert, daß die durchschnittliche 5-Jahre-Überlebensrate der Patienten trotz ausgefeilter chirurgischer Techniken 2% nicht übersteigt.

Gegenwärtig gibt es keine befriedigenden Laborparameter für die Früherkennung von Pankreastumoren. Zur Diagnostik kolorektaler Karzinome wird der Hämokkult-Test eingesetzt, bei welchem okkultes Blut im Stuhl nachgewiesen wird. Die analytische Aussagekraft dieses Testes ist unbefriedigend, weil okkultes Blut im Stuhl auch bei nichtmalignen Erkrankungen wie Hämorrhoiden auftritt, und weil positive Befunde darüber hinaus auch durch eine Vielzahl interferierender Stuhlkomponenten wie Peroxydasen und Katalasen verursacht sein können. Andererseits ist bekannt, daß Tumoren mit einem Durchmesser von weniger als 2 cm nicht genügend Blut abgeben, um im Hämokkult-Testverfahrens aufzufallen.

So liegt selbst bei fortgeschrittenen Dickdarntumoren die diagnostische Sensitivität des Hämokkult-Testes bei nur 50-70%.

Eine mögliche Alternative für die Früherkennung von Pankreas- und Dickdarntumoren bietet der molekularbiologische Nachweis von relevanten Mutationen in Onkogenen, vorzugsweise im

Protoonkogen Ki-ras. So konnte nachgewiesen werden, daß Mutationen im Ki-ras Protoonkogen bei 75-90% von Pankreaskarzinomen (Almoguera, S., Shiote, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., Perucho, M. (1988) Cell 53, 549-554) sowie bei wenigstens 50% kolorektaler Karzinomen (Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W.E., Perucho, M. (1987) Nature 327, 298-303) vorkommen.

Die Frequenz beim Pankreaskarzinom ist bisher die höchste, welche für ein Onkogen bei einem spezifischen Tumor gefunden wurde.

Darüber hinaus sind die relevanten Mutationen auf die Kodons von drei Aminosäuren beschränkt; beim Pankreaskarzinom nur auf eine Aminosäure. Dieser Umstand kann den Mutationsnachweis beträchtlich vereinfachen.

Sowohl bei Dickdarm- als auch bei Pankreastumoren gibt es die Möglichkeit eines nicht invasiven Nachweises des Onkogenstatus im Stuhl. Ein solcher Nachweis wurde erstmals 1992 von Sidransky und Mitarbeitern gezeigt (Sidransky, D., Tokino, T., Hamilton, S.R., Kinler, K.W., Levin, B., Vogelstein, B. (1992); Science 256, 102-105). Er gelingt, weil zum einen eine genügende Zahl von Pankreas- und Darmepithelzellen in den Stuhl gelangen, wobei Tumorzellen unter den Bedingungen im Stuhl möglicherweise stabiler sind als normale Epithelien. Zum zweiten besitzen Bakterien keine Gene für Ki-ras, so daß die Diagnostik nicht durch die Interferenz von Darmflora und Epithelzellen beeinträchtigt wird. Über die Detektion von aktiviertem Ki-ras lassen sich Adenome bis zu einer Größe von 1 cm³ diagnostizieren.

Trotz dieser günstigen Vorbedingungen für eine labordiagnostische Anwendung findet sich bis heute kein Nachweisverfahren für Ki-ras Mutationen in Stuhl-DNS, das routinemäßig eingesetzt werden kann.

Das Hauptproblem hierbei liegt in der enormen Schwierigkeit begründet, DNS von ausreichender Qualität mit einem

vertretbaren Aufwand aus Stuhlproben zu isolieren. Die zur Zeit am häufigsten praktizierte Extraktionsmethode beinhaltet eine Reihe von mehrstündigen Reinigungsschritten und erstreckt sich in seiner Gesamtdurchführung auf mindestens eine Arbeitswoche.

Auch weitere Verbesserungen dieser Methode durch Caldas und Mitarbeiter erfordern auch einen mehrtägigen Durchführungsaufwand (Caldas, C., Hahn, S.A., Hruban, R.H., Redston, M.S., Yeo, C.J., Kern, S.E. (1994); Cancer Res. 54, 3568-3573).

Stuhl ist ein komplexes Gemisch aus abgeschilferten Zellen, Mikroorganismen, unverdauten Nahrungsbestandteilen, Schleim- und Farbstoffen sowie anderen löslichen und unlöslichen Komponenten des Gastrointestinaltraktes. Eine solche komplexe Zusammensetzung bedingt das Vorhandensein einer Vielzahl von inhibitorischen Stoffen, welche sowohl als kontaminierende Bestandteile der isolierten DNS-Lösung wie auch direkt in die DNS intercalieren oder an der DNS gebunden sind und aus diesem Grunde eine Verwendung der isolierten DNS für weitere Untersuchungen verhindern.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein routinemäßig einsetzbares Nachweisverfahren für ein entsprechendes Gendiagnostiksystem zu entwickeln, wobei einer geeigneten DNS-Extraktionsmethode eine Schlüsselfunktion für die Etablierung eines routinetauglichen und letztlich auch automatisierbaren Ki-ras Tests zukommt, sowie einen darauf aufbauenden Testkit bereitzustellen.

Die Aufgabe wird gemäß der Ansprüche 1 bis 15 realisiert. Sie wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß über multiple Reinigungsschritte aus Materialproben, vorzugsweise aus Stuhlproben genomische DNS extrahiert wird, wobei alle inhibitorischen Stoffe hochselektiv eliminiert werden, so daß die isolierte genomische DNS problemlos für weitere Anwendungen verfügbar ist.

Ausgangsmaterialien im Sinne der Erfindung können sein Stuhlproben, Biopsieproben aus gastrointestinalen Polypen nach endoskopischer Entnahme, ercp-Flüssigkeiten aus Pankreas, Sputum, ggf. auch Blut, Plasma, Serum und Urin.

Insbesondere Stuhlproben werden erfindungsgemäß in einem ersten Schritt mit Materialien, die Adsorptionseigenschaften aufweisen, zur Entfernung inhibitorischer Stoffe inkubiert. Die in den Proben enthaltenen Zellen werden mit einem Puffer, der chaotrope Salze enthält, lysiert.

Die nachfolgend an ein mineralisches Trägermaterial gebundene genomische DNS wird in einem weiteren Waschprozeß weiter aufgereinigt und danach mittels eines Puffers geringer Ionenstärke vom Trägermaterial abgelöst. In einem abschließenden Aufreinigungsschritt werden dann auch die in die oder an die DNS gebundenen Stoffe (Inhibitoren) entfernt. Gerade diese in oder an DNS gebundenen Stoffe stellen potente Inhibitoren dar. Diese werden durch Inkubation der bereits isolierten DNS mit einem Puffer mit einer Ionenstärke $> 4M$, welcher ein chaotropes Salz enthält, so z.B. aus Natriumjodid von der DNS verdrängt. Eine anschließende Zugabe des Trägermaterials zur erneuten Bindung der DNS, nachfolgendes Waschen und Elution der DNS bilden den Abschluß des Reinigungsverfahrens. Die auf diese Weise isolierte DNS aus den Proben steht nun weiteren molekularbiologisch-diagnostischen Techniken zur Verfügung.

Im einzelnen werden erfindungsgemäß folgende Reinigungsschritte durchgeführt:

- a) Gegebenenfalls Inkubation mit vorzugsweise chromatographischen Materialien mit Adsorptionseigenschaften, vorzugsweise mit einer Lösung aus Aktivkohle, zur Entfernung inhibitorischer Stoffe bei Verwendung einer Stuhlprobe;
- b) Lyse der in den Materialproben enthaltenen Zellen mit einem Puffer, der chaotrope Salze enthält, wie z. B. Guanidinisothiocyanat, Guanidinhydrochlorid, Lithiumchlorid oder Lithiumchlorid/Harnstoff-Gemische mit Ionenstärken $> 4M$;

- c) Inkubation des Lysates mit einem mineralischen Trägermaterial zur Bindung der DNS; vorzugsweise handelt es sich bei dem Trägermaterial um hochdisperse, nichtporöse SiO_2 -Partikeln mit einer Korngröße von 7 nm - 1 μm , vorzugsweise 40 nm, bei einer spezifischen Oberfläche von 10-300 m^2/g , vorzugsweise 50 m^2/g ,
- d) Abtrennung der Trägermaterials vom Lysat durch Zentrifugation,
- e) Waschen der am Trägermaterial gebundenen DNS, vorzugsweise einem Waschpuffer bestehend aus 50 mM NaCl, 10 mM Tris HCl und 1 mM EDTA sowie 70%v/v Ethanol, und Ablösen der DNS durch Inkubation des Trägermaterials mit einem Puffer geringer Ionenstärke, vorzugsweise 10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA bei einer Temperatur von 48-65°C,
- f) Inkubation der abgelösten genomischen DNS mit einem Puffer, welcher ein chaotropes Salz enthält, vorzugsweise aus Natriumjodid, Natriumperchlorat oder Kaliumjodid mit Ionenstärken >4M bei kontinuierlichem Schütteln, vorzugsweise mit 5M Natriumjodid, zur Entfernung an die DNS gebundenen Substanzen aus der genomischen DNS,
- g) Inkubation der Pufferlösung mit der genomischen DNS erneut mit einem mineralischen Trägermaterial, vorzugsweise aus hochdispersen, nichtporösen SiO_2 -Partikeln mit einer Korngröße von 7 nm - 1 μm , vorzugsweise 40 nm, bei einer spezifischen Oberfläche von 10-300 m^2/g , vorzugsweise 50 m^2/g ,
- h) Abtrennen der Lösung vom mineralischen Trägermaterial durch Zentrifugation,
- i) Waschen des Trägermaterials mit der gebundenen DNS, vorzugsweise mit einem Puffer bestehend aus 50 mM NaCl, 10 mM Tris HCl und 1 mM EDTA sowie 70%v/v Ethanol, und wiederum Ablösen der gebundenen genomischen DNS mit einem Puffer geringer Ionenstärke, bevorzugt 10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA bei einer Temperatur von 48-65°C.

Das Extraktionsverfahren wird gemäß der Erfindung bevorzugt als batch- Verfahren oder als säulenchromatographisches Verfahren oder als chromatographisches Verfahren in Mikrotiterplattenformat durchgeführt.

Das gesamte Extraktionsverfahren benötigt weniger als 2h für mindestens 10 unterschiedliche Proben und löst damit erstmalig in idealster Weise das Problem der Extraktion genomischer DNS aus Stuhlproben und anderen Materialien. Die Erfindung erlaubt die Isolierung von DNS aus abgeschilferten Zellen aus Stuhlproben in extrem kurzer Zeit, wobei überraschenderweise durch den bevorzugten Einsatz einer Lösung aus Aktivkohle im erfinderischen Reinigungsverfahren inhibitorische Stoffe, welche nicht direkt an die genomische DNS gebunden sind, eliminiert werden konnten.

Der erfindungsgemäße Nachweis klinisch relevanter Veränderungen der DNS Sequenz des Ki-ras Gens erfolgt anschließend über basenkomplementäre Hybridisierungsreaktionen nach an sich bekannten Techniken mit mindestens sechs verschiedenen Oligonukleotiden mit definierter Komplementarität zu möglichen mutativ veränderten Sequenzabschnitten des Ki-ras Gens.

Nach erfolgter Extraktion der genomischen DNS aus der klinischen Probe schließt sich die Erzeugung der zu analysierenden Ki-ras-Sequenz an.

Die Oligonukleotide und die nachzuweisenden sequenzveränderten Abschnitte des Ki-ras Gens werden inkubiert, wobei entweder die Oligonukleotide oder die nachzuweisenden sequenzveränderten Abschnitte des Ki-ras Gens markiert sind und der Nachweis des Hybridisierungsergebnisses über die Markierung detektiert wird oder andere an sich bekannte Nachweisverfahren für Duplex-DNS zum Nachweis des Hybridisierungsergebnisses verwendet werden.

Die Oligonukleotide und/oder die sequenzveränderten Abschnitte des Ki-ras Gens oder hybridisierte DNS befinden sich dazu an einer festen Phase, die vorzugsweise eine Mikrotiterplatte, ein Lichtwellenleiter oder ein Siliciumchip ist, besonders bevorzugt eine Mikrotiterplatte.

Die Amplifikationsreaktion erfolgt mit einem Primerpaar, wobei einer der Primer an seiner 5'-Position mit einer Markierung, vorzugsweise einer Biotin-Markierung, gekoppelt ist. Das nach einer Vervielfältigungsreaktion generierte DNS-Fragment ist dadurch ebenfalls markiert. Diese Markierung ermöglicht nachfolgend die Kopplung des amplifizierten Ki-ras-Fragmentes in einer bevorzugten Ausführungsvariante an die Oberfläche einer Streptavidin beschichteten festen Phase, vorzugsweise an die Oberfläche einer Mikrottestplatte über eine Streptavidin-Biotin-Brücke.

Das an der Oberfläche gebundene doppelsträngige Fragment wird unter Zugabe einer an sich bekannten Denaturierungslösung, wie z.B. NaOH, in einen Einzelstrang überführt. Auf der Oberfläche der Mikrottestplatte verbleibt nach Absaugen der Denaturierungslösung nur der über die Biotin-Streptavidin-Brücke fixierte DNS-Strang. Dieser ist somit der Analyt und entspricht dem auf das Vorhandensein von Einzelbasenmutationen zu untersuchenden Ki-ras-Abschnitt. Der plattenfixierte Ki-ras-Einzelstrang wird in nachfolgenden Schritten mit allelspezifischen Oligonukleotiden (Hybridisierungssonden) unter einem Standard-Hybridisierungspuffer inkubiert. Die Oligonukleotide entsprechen dabei jeweils einer möglichen Ki-ras Punktmutation bzw. der Ki-ras Wildtypsequenz.

Die Auswahl der Oligonukleotide erfolgte erfindungsgemäß unter dem Aspekt, die Hybridisierungsreaktionen für jede der verschiedenen allelspezifischen Oligonukleotide unter absolut identischen Reaktionsparametern durchzuführen, um Mutationstests simultan für unterschiedliche Punktmutationen auf einer Mikrottestplatte zu realisieren.

Die 6 Oligonukleotide weisen vorzugsweise die Sequenzen

5'-GTT-GGA-GCT-CGT-GGC-GTA-3'

5'-GTT-GGA-GCT-TGT-GGC-GTA-3'

5'-GTT-GGA-GCT-AGT-GGC-GTA-3'

5'-GTT-GGA-GCT-GCT-GGC-GTA-3'

5'-GTT-GGA-GCT-GAT-GGC-GTA-3'

5'-GTT-GGA-GCT-GTT-GGC-GTA-3' .

Der entscheidende Schritt für den Nachweis einer Einzelbasenmutation besteht in hochoptimierten Reaktionsbedingungen für essentielle Waschschrte nach der erfolgten Hybridisierungsreaktion.

Gemäß der Erfindung erfolgen ein bis fünf, vorzugsweise drei, Waschschrte nach einer 15 bis 45-minütigen, vorzugsweise 30 minütigen, Inkubationszeit bei 38 - 45 °C, vorzugsweise 42 °C, bei jeweils 5 bis 15 Minuten, vorzugsweise 10 Minuten, mit einer Waschlösung aus SDS und SSC bei einer Temperatur von 45 bis 55 °C, vorzugsweise 0,03 % SDS und 0,03 % SSC bei 50 °C und 10 Minuten.

Entscheidend dabei ist, daß nur bei vollständiger Basenkomplementarität zwischen Ki-ras-Target und dem jeweiligen Hybridisierungsoligonukleotid ein Hybridisationsprodukt erhalten bleibt, jede Baseninkomplementarität aber zur selektiven Entfernung der Oligonukleotidsonde führt.

Diese Bedingungen konnten im erfinderischen Verfahren in idealster Weise gelöst werden. Die optimierten Bedingungen der Waschschrte erlauben dabei zusätzlich die simultane Testdurchführung zum Nachweis von sechs verschiedenen Ki-ras-Mutationen auf einer Testplatte.

Der Nachweis des Hybridisierungsergebnisses erfolgt über eine dem Fachmann an sich bekannten indirekt enzymatischen kolorimetrischen Detektion. Diese basiert darauf, daß die Hybridisierungsoligonukleotide mit einer Standardmarkierung z.B. Digoxigenin oder FITC versehen sind, gegen welche enzymkonjugierte Antikörper eingesetzt werden. Nach Zugabe einer Substratlösung wird letztlich via Durchlichtmessung in einem Mikrotestplatten-Reader die Intensität der Farbreaktion bestimmt. Sie ist das Parameter für die Befundung des Hybridisierungsergebnisses. Mitgeführte Standard-DNS Proben für eine Ki-ras Mutation bzw. für Ki-ras Wildtyp werden s

Bezugsgrößen für die Bewertung der Probenanalysen herangezogen.

Das Nachweisverfahren wird bevorzugt in Mikrotiterplatten durchgeführt und hat somit den Vorteil, daß die Möglichkeit der Analyse einer Vielzahl unterschiedlicher Proben besteht, wodurch eine Automatisierung des Verfahrens ermöglicht wird.

Bisher bekannte Nachweisverfahren von Mutationen über Hybridisierungsreaktionen werden nur mittels bekannter molekularbiologischer Techniken, wie z.B. Dot-Blot-Hybridisierungen, an Filtermembranen durchgeführt, bei welchen der Nachweis der Hybridisierungsreaktion über die Detektion einer radioaktiven Markierung erfolgt. Ein solches Verfahren ist extrem zeitaufwendig und durch die Verwendung radioaktiver Nachweisverfahren zudem hochgefährlich, ebenso ist eine Automatisierbarkeit nicht möglich.

Das erfinderische Verfahren benötigt einschließlich der DNS-Extraktion aus den Proben ca. 8h. Dies ist ein Zeitaufwand, welcher es zum ersten Mal ermöglicht, den Ki-ras Status in einer routinemäßigen Labordiagnostik als den wohl wichtigsten klinischen Parameter für die Früherkennung maligner Veränderungen, vorzugsweise von Kolon und Pankreas zu nutzen.

Eine solche Diagnostik wird wesentlich dazu beitragen, die Mortalitätsraten dieser Erkrankungen senken zu helfen.

Die Erfindung betrifft außerdem einen Testkit zum Nachweis von Mutationen im Ki-ras-Gen. Diese ist durch einen modularen Aufbau charakterisiert und besteht aus:

1. DNS-Extraktionssystem, vorzugsweise

a) eine Lösung aus Aktivkohle, zur Entfernung inhibitorischer Stoffe bei Verwendung einer Stuhlprobe,

- b) zur Lyse der in den Materialproben enthaltenen Zellen einen Puffer, der chaotrope Salze enthält, wie z. B. Guanidinisothiocyanat, Guanidinhydrochlorid, Lithiumchlorid oder Lithiumchlorid/Harnstoff-Gemische mit Ionenstärken $>4M$; besonders bevorzugt Guanidinisothiocyanat; DTT, Natriumcitrat,
- c) zur Inkubation des Lysates einen mineralischen Träger Bindung der DNS; vorzugsweise hochdisperse, nichtporöse SiO_2 -Partikel mit einer Korngröße von $7\text{ nm} - 1\text{ }\mu\text{m}$, vorzugsweise 40 nm , bei einer spezifischen Oberfläche von $10-300\text{ m}^2/\text{g}$, vorzugsweise $50\text{ m}^2/\text{g}$,
- d) einen Waschpuffer bestehend aus 50 mM NaCl , 10 mM Tris HCl und 1 mM EDTA sowie $70\%v/v$ Ethanol, und Ablösen der DNS durch Inkubation des Trägermaterials mit einem Puffer geringer Ionenstärke, vorzugsweise 10 mM Tris HCl ; $0,1\text{ mM EDTA}$,
- e) zur Inkubation der abgelösten genomischen DNS einen weiteren Puffer, welcher ein chaotropes Salz enthält, vorzugsweise aus Natriumjodid, Natriumperchlorat oder Kaliumjodid mit Ionenstärken $>4M$, besonders bevorzugt 5 M Natriumjodid ,
- i) zum Waschen des Trägermaterials mit der gebundenen DNS, vorzugsweise einen Puffer bestehend aus 50 mM NaCl , 10 mM Tris HCl und 1 mM EDTA sowie $70\%v/v$ Ethanol,
2. Primermixen zur selektiven Amplifikation der zu untersuchenden Ki-ras-Targetsequenz,
3. Kontrollzelllinien-DNA zur Amplifikation von Wildtyp bzw. Mutationstyp einer Ki-ras-Zelllinie,
4. 6 Oligonukleotidsonden mit den Sequenzen
- 5'-GTT-GGA-GCT-CGT-GGC-GTA-3'
 - 5'-GTT-GGA-GCT-TGT-GGC-GTA-3'
 - 5'-GTT-GGA-GCT-AGT-GGC-GTA-3'
 - 5'-GTT-GGA-GCT-GCT-GGC-GTA-3'

5'-GTT-GGA-GCT-GAT-GGC-GTA-3'

5'-GTT-GGA-GCT-GTT-GGC-GTA-3' ,

5. eine feste Phase, vorzugsweise eine Mikrottestplatte einschließlich für den Platten-Assay notwendiger Reagenzien wie oben beschrieben.

Das System wird vorzugsweise für die Untersuchung von Stuhl-DNS zur Früherkennung von gastrointestinalen Tumoren, speziell für die Früherkennung präneoplastischer kolorektaler proliferativer Erkrankungen eingesetzt.

Durch die Universalität des DNS-Extraktionsverfahrens und über den modularen Aufbau des Testkits besteht aber auch die Möglichkeit, andere klinisch relevante Ausgangsmaterialien auf Ki-ras-Mutationen zu untersuchen. Dabei bleibt das Nachweissystem immer konstant.

Die eigenen Untersuchungsergebnisse erbrachten so auch den Nachweis von Ki-ras Mutationen nach erfolgter DNS-Extraktion aus Pankreassekreten (ercp-Proben). Es besteht damit erstmalig die Möglichkeit des Auffindens von Risikopatienten für Pankreastumoren nach Untersuchung dieses Probenmaterials. Dem Fachmann ist bekannt, daß endzündliche Prozesse des Pankreas (akute oder chronische Pankreatiden) häufig in maligne Phänotypen entarten können. Ein vorhandener Pankreastumor ist zum Zeitpunkt seines Nachweises aber nicht mehr kurativ behandelbar. Der Nachweis von mutativen Veränderungen im Ki-ras-Gen kann somit als entscheidender Parameter für eine diesbezügliche Prognose herangezogen werden.

Das erfinderische Verfahren eignet sich darüber hinaus auch in idealer Weise zur Untersuchung von Biopsieproben aus gastrointestinalen Polypen nach endoskopischer Entnahme. Auch bei diesen Proben kann über die Detektion von Ki-ras Mutationen frühzeitig eine potentiell bestehende mögliche maligne Veränderungen diagnostiziert und können Patienten als

Risikopatienten eingestuft werden. Über eine rechtzeitig erfolgende chirurgische Entfernung Ki-ras-mutierter Polypen kann so die Entstehung eines Tumors unterbunden werden. Bis heute findet eine solche Diagnostik auf Grund des Fehlens eines routinetauglichen Nachweissystems nicht statt.

Gemäß der Erfindung werden zur Untersuchung der Ki-ras-Targetsequenz mindestens 6 verschiedenen Oligonukleotide, die definierte Komplementarität zu bekannten mutativ veränderten Sequenzabschnitten des Ki-ras Gens aufweisen, eingesetzt. Damit besteht die Möglichkeit, mehr als 80% aller in Zusammenhang mit einem malignen Phänotyp stehenden Ki-ras Mutationen eindeutig zu detektieren.

Anschließend soll die Erfindung an einem Beispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel:

Nachweis von Ki-ras-Punktmutationen in Stuhl-DNS

Überführen von ca. 300-500 mg einer Stuhlprobe in ein 2.0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Zugabe von 350 µl einer Waschlösung (NaCl, Tris; EDTA) und vortexen.

Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm und Überführen des Überstandes in ein neues 2.0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß.

Zugabe von 250 µl einer Lösung aus Aktivkohle; 10 min Schütteln der Probe. Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm und Überführen des Überstandes in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm und Überführen des Überstandes in ein neues 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß.

Zugabe von 1 ml Puffer (Guanidinisothiocyanat; DTT, Natriumcitrat) zur Zell-Lyse und Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.

Zugabe von 20 μ l einer mineralischen Trägersuspension aus hochdispersen, nichtporösen SiO_2 - Partikeln mit einer Korngröße von ca. 40 nm, bei einer spezifischen Oberfläche von ca. 50 m^2/g , und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Zentrifugation für 1 s bei 10000 rpm und sorgfältiges Entfernen des Überstandes.

Zugabe von 1 ml Waschpuffer (NaCl, Tris, EDTA, Ethanol) und Resuspendieren des Pellets. Zentrifugation für 1 s bei 10000 rpm und sorgfältiges Entfernen des Überstandes. Zweimaliges Wiederholen des Waschschrilles. Kurze Inkubation des geöffneten Reaktionsgefäßes bei 60°C bis zur vollständigen Entfernung des Ethanolis.

Zugabe von 100 μ l eines Elutionsmittels (10mM Tris-HCl; 0.1mM EDTA), Resuspendieren des Pellets und Inkubation des Reaktionsgefäßes für 5 min bei 60°C. Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm und Überführen des Überstandes in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. Mischen der isolierten DNS mit einer Lösung aus Natriumjodid unter leichtem Schütteln für 5 min.

Erneute Zugabe von 15 μ l der mineralischen Trägersuspension zur Pufferlösung mit der genomischen DNS und Inkubation für 5 min auf Eis. Zentrifugation für 1 s bei 10000 rpm und sorgfältiges Entfernen des Überstandes.

Zugabe von 1 ml Waschpuffer und Resuspendieren des Pellets. Zentrifugation für 1 s bei 10000 rpm und sorgfältiges Entfernen des Überstandes. Zweimaliges Wiederholen des Waschschrilles. Kurze Inkubation des geöffneten Reaktionsgefäßes bei 60°C bis zur vollständigen Entfernung des Ethanolis. Zugabe von 50 μ l Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl; 0.1 mM EDTA), Resuspendieren des Pellets und Inkubation

des Reaktionsgefäßes für 5 min bei 60°C. Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm und Überführen des Überstandes in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß.

Nach der erfolgten DNS-Extraktion werden 1-10 µl der DNS für die enzymatische Vervielfältigung der zu untersuchenden spezifischen Targetsequenz des Ki-ras Gens mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingesetzt.

In einer ersten PCR-Reaktion erfolgt dabei die Amplifikation mit einem Primermix, bei welchem während der Amplifikationsreaktion von Ki-ras-Wildtyp-DNA eine Restriktionschnittstelle generiert wird. In alle amplifizierten DNA-Fragmente welche nicht wildtypkonform sind, erfolgt dagegen kein Einbau dieser Schnittstelle.

Nach der erfolgten Amplifizierungsreaktion wird unter Einsatz eines Restriktionsenzym der Ki-ras-Wildtyp zerschnitten.

In einer zweiten Amplifikationsreaktion werden 1-2 µl des Restriktionsansatzes als Template DNS eingesetzt. Dabei erfolgt nunmehr die selektive Anreicherung der ungeschnittenen mutierten Ki-ras-Fragmente. Diese Amplifikationsreaktion erfolgt mit einem Primerpaar, bei welchem ein Primer an seiner 5'-Position Biotin-markiert ist.

Nach erfolgter Amplifikationsreaktion werden 1-5 µl des Amplifikationsproduktes in 420 µl eines Bindungspuffers (Tris; EDTA, NaCl) aufgenommen.

Jeweils 50 µl dieses Ansatzes werden auf 7 Löcher (Wells) einer Mikrottestplatte verbracht. Diese Wells dienen nachfolgend der Analyse des Ki-ras-Fragmentes auf mutative Veränderungen.

Nach einer kurzen Inkubation wird die Bindungspufferlösung abgesaugt, 50 µl einer Denaturierungslösung (NaOH) zugegeben und unter leichtem Schütteln inkubiert. Hierbei erfolgt nun die Generierung eines DNA-Einzelstranges, gegen welchen

nachfolgend eine jeweils sequenzspezifische Hybridisierung durchgeführt wird. Nach Entfernung des nicht an der Plattenoberfläche fixierten zweiten DNA-Stranges mit einem Waschpuffer (Tris, EDTA, NaCl) wird jedes der 7 Wells der Mikrotestplatte mit einer der spezifischen z.B. Digoxigenin oder FITC markierten Oligonukleotidsonden unter einem Standard-Hybridisierungspuffer benetzt.

Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei 42°C erfolgt die Hybridisierung der jeweiligen Sonden mit dem an der Plattenoberfläche gebundenen Ki-ras-Fragment.

Die Spezifität des Nachweises wird durch nachfolgend durchzuführende Waschschrte unter hochstringenten Konditionen erreicht. Diese Waschschrte erfolgen mit einer Lösung aus 0,03% SDS; 0,03xSSC bei 50°C für 3x10min. Unter diesen Konditionen werden alle Sonden, die keine vollständige Basenkomplementarität zur Ki-ras-Targetsequenz aufweisen, entfernt.

In nachfolgenden Schritten erfolgt nach an sich bekannten klassischen kolorimetrischen Verfahren die Detektion des Hybridisierungsergebnisses unter Verwendung eines Mikrotestplatten-Readers. Die gemessene Signalstärke dient dabei als das Auswertungskriterium für den Nachweis eines Hybridisierungsproduktes, und somit als Nachweis auf das Vorliegen einer Mutation oder von Wildtyp Ki-ras.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis klinisch relevanter Veränderungen der DNS-Sequenz des Ki-ras Onkogens in DNS

gekennzeichnet durch

- Extraktion genomischer DNS aus Materialproben über multiple Reinigungsschritte zur Eliminierung inhibitorischer Stoffe und
- basenkomplementäre Hybridisierungsreaktion durch Zugabe von sechs Oligonukleotiden mit definierter Komplementarität zu veränderten Sequenzabschnitten des Ki-ras Gens.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Extraktion der genomischen DNS erfolgt durch:

- Lyse der in der Probe enthaltenen Zellen mit einem Puffer, der chaotrope Salze enthält;
- Inkubation des Lysates mit einem mineralischen Trägermaterial zur Bindung der DNS;
- Abtrennung des Trägermaterials vom Lysat durch Zentrifugation;
- Waschen der am Trägermaterial gebundenen DNS und Elution der DNS durch Inkubation des Trägermaterials mit einem Puffer geringer Ionenstärke;
- Inkubation der abgelösten genomischen DNS mit einem Puffer, welcher ein chaotropes Salz enthält zur Entfernung von an die DNS gebundenen Substanzen aus der genomischen DNS;
- Inkubation der Pufferlösung mit der genomischen DNS erneut mit einem mineralischen Trägermaterial;
- Abtrennen der Lösung vom mineralischen Trägermaterial durch Zentrifugation;
- Waschen des Trägermaterials mit der gebundenen DNS und erneut Elution der gebundenen genomischen DNS mit einem Puffer geringer Ionenstärke.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2,

dadurch gekennzeichnet, daß

Stuhlproben als Ausgangsmaterial dienen, die in einem ersten Schritt mit Materialien mit Adsorptionseigenschaften zur Entfernung inhibitorischer Stoffe inkubiert werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, daß
als chromatographisches Material eine Lösung aus Aktivkohle eingesetzt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet, daß

- als chaotrope Salze Guanidinisoithiocyanat, Guanidinhydrochlorid, Lithiumchlorid oder Lithiumchlorid/Harnstoff-Gemische mit Ionen-stärken > 4M Verwendung finden,
- als mineralische Trägermaterialien nichtporöse SiO_2 - Partikel mit einer Korngröße von 7 nm - 1 μm , vorzugsweise 40 nm, bei einer spezifischen Oberfläche von 10-300 m^2/g , vorzugsweise 50 m^2/g , eingesetzt werden,
- als Waschpuffer ein Gemisch bestehend aus 50 mM NaCl, 10 mM Tris HCl und 1 mM EDTA sowie 70%v/v Ethanol dient,
- zur Elution als Puffer niedriger Salzkonzentration 10 mM Tris HC, 0,1 mM EDTA eingesetzt wird und die Elution bei einer Temperatur von 48-65°C stattfindet und
- die erneute Inkubation der eluierten genomischen DNS mit einem Puffer aus Natriumjodid, Natriumperchlorat oder Kaliumjodid mit Ionenstärken >4M bei kontinuierlichem Schütteln erfolgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Lyse mit einem Puffer enthaltend Guanidinisoithiocyanat, DTT und Natriumcitrat und die zweite Inkubation mit 5 M Natriumjodid durchgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Oligonukleotide mit den folgenden Sequenzen verwendet werden:

5'-GTT-GGA-GCT-CGT-GGC-GTA-3'
5'-GTT-GGA-GCT-TGT-GGC-GTA-3'
5'-GTT-GGA-GCT-AGT-GGC-GTA-3'
5'-GTT-GGA-GCT-GCT-GGC-GTA-3'
5'-GTT-GGA-GCT-GAT-GGC-GTA-3'
5'-GTT-GGA-GCT-GTT-GGC-GTA-3'

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Oligonukleotide und die nachzuweisenden sequenzveränderten Abschnitte des Ki-ras Gens inkubiert werden, wobei entweder die Oligonukleotide oder die nachzuweisenden sequenzveränderten Abschnitte des Ki-ras Gens markiert sind und der Nachweis des Hybridisierungsergebnisses über die Markierung detektiert wird oder andere an sich bekannte Nachweisverfahren für Duplex-DNS zum Nachweis des Hybridisierungsergebnisses verwendet werden.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Oligonukleotide und/oder die sequenzveränderten Abschnitte des Ki-ras Gens oder hybridisierte DNS sich an einer festen Phase befinden.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet, daß
die feste Phase eine Mikrotiterplatte, ein Lichtwellenleiter oder ein Siliciumchip ist.
11. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet, daß
die nachzuweisende Ki-ras-Sequenz mit einem Primerpaar, wobei einer der Primer an seiner 5'-Position markiert ist, amplifiziert wird, anschließend an eine feste Phase gekoppelt und in einen Einzelstrang überführt wird, mit den sechs Oligonukleotiden 15-45 Minuten bei einer Temperatur von 38-45 °C inkubiert, mit einer Waschlösung aus SDS und SSC bei 45-55 °C ein bis fünf mal für 5 bis 15 Minuten gewaschen wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Kopplung über eine Streptavidin-Biotin-Brücke erfolgt, die Inkubation 30 Minuten bei Temperatur von 42 °C stattfindet und 3 mal/10min mit einer Lösung 0,03 % SDS und 0,03 % SSC bei 50 °C gewaschen wird.

13. Verwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 12 zur Früherkennung von Tumoren auf der Basis von klinisch relevanten Veränderungen der DNS-Sequenz des Ki-ras Onkogens in DNS, vorzugsweise zur Früherkennung von Pankreas- und Dickdarmtumoren aus Stuhlproben, ercp-Flüssigkeiten und endoskopisch gewonnenen Darmpolyphen.

14. Testkit zur Früherkennung von Tumoren auf der Basis von klinisch relevanten Veränderungen der DNS-Sequenz des Ki-ras Onkogens in DNS, vorzugsweise zur Früherkennung von Pankreas- und Dickdarmtumoren aus Stuhlproben umfassend

- DNS-Extraktionssystem enthaltend Lösungen und Puffer gemäß Ansprüchen 3 bis 6,
- Primermixen zur selektiven Amplifikation der zu untersuchenden Ki-ras-Targetsequenz
- Kontrollzelllinien-DNS zur Amplifikation von Wildtyp bzw. Mutationstyp einer Ki-ras-Zelllinie,
- Oligonukleotidsonden gemäß Anspruch 7,
- eine feste Phase gemäß Anspruch 10 samt Reagenzien gemäß Anspruch 11 oder 12.

15. Testkit nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet, daß

- die feste Phase eine Streptavidin-beschichtete Mikrotestplatte ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/01894

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C1201/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C120		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CALDAS ET AL.: "Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia" CANCER RESEARCH, vol. 54, July 1994, pages 3568-3573, XP002050203 cited in the application see the whole document ---	1-15
Y	EP 0 535 376 A (IMMUNOBION LTD) 7 April 1993 see the whole document ---	1-15
Y	WO 95 34569 A (INVITEK GMBH ;HILLEBRAND TIMO (DE); BENDZKO PETER (DE); PETERS LAR) 21 December 1995 see the whole document ---	1-15
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">15 December 1997</div>	Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">14/01/1998</div>	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <div style="text-align: center;">Molina Galan, E</div>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. Application No

PCT/DE 97/01894

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WILDE ET AL.: "Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and PCR"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 28, 1990, WASHINGTON, US, pages 1300-1307, XP000406095</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	1-15
A	<p>SIDRANSKI ET AL.: "Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors"</p> <p>SCIENCE, vol. 256, April 1992, LANCASTER, PA US, pages 102-105, XP000605488</p> <p>cited in the application</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 93 20235 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 14 October 1993</p> <p>---</p>	
A	<p>US 4 902 783 A (GODA HIDEO ET AL) 20 February 1990</p> <p>---</p>	
P,Y	<p>DE 195 30 132 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 20 February 1997</p> <p>see the whole document</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. Appl. No.

PCT/DE 97/01894

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0535376 A	07-04-93	JP 5060761 A AU 2121492 A CA 2077157 A	12-03-93 04-03-93 01-03-93
WO 9534569 A	21-12-95	DE 4422040 A DE 4422044 A DE 4447015 A EP 0765335 A	21-12-95 21-12-95 04-07-96 02-04-97
WO 9320235 A	14-10-93	CA 2132874 A EP 0672181 A JP 8504081 T	14-10-93 20-09-95 07-05-96
US 4902783 A	20-02-90	JP 2118911 C JP 7089951 B JP 63000297 A CA 1276899 A FR 2600341 A	06-12-96 04-10-95 05-01-88 27-11-90 24-12-87
DE 19530132 A	20-02-97	AU 6821696 A WO 9707239 A	12-03-97 27-02-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 97/01894

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CALDAS ET AL.: "Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia" CANCER RESEARCH, Bd. 54, Juli 1994, Seiten 3568-3573, XP002050203 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-15
Y	EP 0 535 376 A (IMMUNOBION LTD) 7. April 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-15
Y	WO 95 34569 A (INVITEK GMBH; HILLEBRAND TIMO (DE); BENDZKO PETER (DE); PETERS LAR) 21. Dezember 1995 siehe das ganze Dokument ---	1-15
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 15. Dezember 1997		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 14/01/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Molina Galan, E

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

PCT/DE 97/01894

Kalegona®

Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile

Betr. Anspruch Nr.	
--------------------	--

Formblatt PCT/SA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/01894

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0535376 A	07-04-93	JP 5060761 A	12-03-93
		AU 2121492 A	04-03-93
		CA 2077157 A	01-03-93
WO 9534569 A	21-12-95	DE 4422040 A	21-12-95
		DE 4422044 A	21-12-95
		DE 4447015 A	04-07-96
		EP 0765335 A	02-04-97
WO 9320235 A	14-10-93	CA 2132874 A	14-10-93
		EP 0672181 A	20-09-95
		JP 8504081 T	07-05-96
US 4902783 A	20-02-90	JP 2118911 C	06-12-96
		JP 7089951 B	04-10-95
		JP 63000297 A	05-01-88
		CA 1276899 A	27-11-90
		FR 2600341 A	24-12-87
DE 19530132 A	20-02-97	AU 6821696 A	12-03-97
		WO 9707239 A	27-02-97